



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 01318**

(22) Data de depozit: **10.12.2010**

(41) Data publicării cererii:
30.09.2011 BOPI nr. 9/2011

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA OVIDIUS CONSTANȚA,**
BD. Mamaia NR.124, CONSTANȚA, CT, RO

(72) Inventatori:
• **ZAMFIRESCU STELA FILOFTEIA,**
BD. Mamaia NR. 124, CONSTANȚA, CT,
RO;

• **ANGHEL ANDREEA HORTANSE,**
ȘOS. I. C. BRĂȚIANU NR. 248,
CONSTANȚA, CT, RO;
• **NADOLU DORINA, ȘOS. I. C. BRĂȚIANU**
NR. 248, CONSTANȚA, CT, RO;
• **SOGORESCU ELENA, BD. MAMAIA**
NR. 124, CONSTANȚA, CT, RO

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE A SERULUI ANTIEMBRION DE
CAPRĂ ȘI DE OAI**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unui ser antiembrion de capră și de oaie, utilizat în domeniul medicinei veterinare și în zootehnie, pentru predicția precoce a gestației la rumegătoare. Procedeu conform invenției presupune colectarea, în picături sterile de mediu PBS cu 4% BSA, a embrionilor preimplantați de ziua 14 și 15, și trecerea succesivă în 8...10 băi de mediu steril, urmată de omogenizarea separată a embrionilor de capră și de oaie, cu obținerea unui omogenat antigen embrionar, ce este amestecat în

proporție de 1/1 cu adjuvant Freund, se repartizează separat, fiind apoi injectat iepurilor pe o perioadă de imunizare de 15 zile, după care se colectează serul de iepure antiembrion de oaie și/sau capră, ce este centrifugat, cu obținerea serului antiproteină asociată gestației, care este supus unei reacții de hemaglutinare, prezența acestei reacții indicând gestația.

Revendicări: 1



767

Procedeu de obținere a unui ser antiembrion de capră și de oaie

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui ser antiembrion de capră și de oaie, utilizat în domeniul medicinei veterinare și în zootehnie pentru predicția precoce a gestației la rumegătoare.

Se cunosc mai multe metode de determinare a gestației la rumegătoarele mici, prin ecografie la 40-45 de zile, prin monitorizarea progesteronului seric, folosind metode radioimunologice (RIA) și enzimoimunologice (EIA-Eliza), histologice și radiografice.

Aceste proceduri prezintă dezavantajul că necesită echipamente scumpe, nu sunt la îndemâna specialiștilor și sunt mari consumatoare de forță de muncă și bani.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în stabilirea unui diagnostic de gestație la oaie și capră în primele 21 de zile după monta fecundă, care să fie executat cu ușurință în practică de specialiști sau fermieri.

Procedeul, conform invenției, elimină dezavantajele menționate prin aceea că într-o primă fază se obține antigenul din omogenat de embrioni preimplantaționali, după care într-o a doua fază se realizează imunizarea pasivă a iepurilor cu antigen embrionar pentru obținerea de ser antiembrion și într-o a treia fază se realizează reacția de hemaglutinare cu ser antiembrion de la oaie și capră.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- realizează o predicție a gestației în procent de peste 90% ;
- este ușor de executat în condiții practice de specialiști sau fermieri;
- are precizie mai mare de 90%;
- este o procedură ieftină și rapidă cu aplicație practică.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a procedului, conform invenției

Modul de realizare al invenției presupune realizarea a 3 etape importante și anume: obținerea antigenului din omogenat de embrioni preimplantaționali, imunizarea pasivă a iepurilor cu antigen embrionar pentru obținerea de ser antiembrion și realizarea reacției de hemaglutinare.

Etapa 1. Obținerea antigenului din omogenat de embrioni.

Embrionii preimplantaționali de ziua 14 și 15 de la monta fecundă se obțin de la oi și capre cu reproducție normală și cunoscută. Inducerea estrului s-a realizat cu bureți Chronogest (Intervet-Olanda) care conțin fluorogestonă 45 mg/ burete la capră și 30 mg/burete la oaie. Bureții se introduc intravaginal pentru o durată de 12 zile la

5

oaie și 11 zile la capră. Tratamentul de superovulație se realizează cu FSHp (Folltropin, Vetrepharm Inc., Ontario, Canada) administrat intramuscular, în 8 doze, la interval de 12 ore, ultima administrare se face în același timp cu retragerea bureților. Tratamentele de superovulație au fost identice la oi și capre, cu excepția administrării la capră, cu 4 zile înainte de ultima injecție de FSHp, a unei doze de 125 µg Prostaglandină F2α (Revoliz, ICChim București). Oile și caprele intră în estru la 24-48 de ore după extragerea bureților și se montează natural cu masculi, de 2 ori/zi până la terminarea estrului. După 14-15 zile de la montă se execută intervenția chirurgicală prin laparotomie, respectând protocoalele uzuale (dietă alimentară, hidrică, contenție și anestezie generală). Coarnele uterine sunt exteriorizate împreună cu ovarele și se numără corpii galberii formați, informație pe baza căreia se estimează numărul de embrioni prezenți în uter.

Colectarea embrionilor s-a efectuat în condiții de sterilitate și ustensile de unică folosință cu ajutorul unui cater TomCat (introdus prin trompa uterină în oviduct) și a unei sondei Folley (introdusă în treimea mijlocie a uterului). Prin aceste catetere se introduc 20 ml mediu PBS cu BSA 4% (fracțiunea V) în direcția oviduct-treimea mijlocie a uterului. Lichidul de spălare antrenează embrionii prezenți în vârful de corn uterin care se recuperează prin sonda Folley în plăci sterile. Plăcile cu mediul de spălare ce conține embrioni se examinează la o stereolupă (x100) pentru colectarea acestora. După ziua a 12-a, embrionii preimplanționali sunt ușor de recunoscut, trofoblastul este alungit (0.7-1mm) și are culoare sidefie, transparentă. Embrionii sunt colectați în picături sterile de mediu PBS cu 4% BSA și trecuți succesiv în 8-10 băi de mediu steril.

Embrionii de oaie și de capră se omogenizează separat prin agitare energetică în câte 0,5 ml în mediu PBS-BSA, câte 0,5 ml/embrion, în vederea obținerii antigenului. Procedul este identic pentru cele două tipuri de antigen. Omogenatul obținut (antigenul embrionar) se amestecă în proporție de 1/1 cu adjuvant incomplet Freund (Sigma S. 5506) apoi se repartizează câte 1 ml în tuburi Ependorf, separat pentru fiecare specie. Antigenul astfel pregătit se pastrează la -18°C până la folosire.

Pentru imunizare se folosesc iepuri (de rasă locală, câte unul pentru fiecare tip de antigen). Sângele se colectează din vena safenă la 36, 42 și 63 de zile de la începerea imunizării. Serul exprimat se depune în tuburi Ependorf de 1,5 ml, se indentifică pe specii și data colectării, după care se pastrează la -18°C până la folosire.

Etapă 2. Obținerea serului antiembrion de oaie sau capră prin imunizarea pasivă a iepurilor

Imunizarea pasivă se efectuează pe iepuri masculi adulți, cărora li se injectează câte 0,2 ml, în 8 puncte (subcutan în părțile laterale ale zonei cervicale, la baza urechilor și în dermul interplantar). S-au folosit câte un iepure pentru fiecare antigen. Imunizarea iepurilor s-a făcut după o schemă originală în interval de 15 zile (în primele zile se administrează antigen 3 zile consecutiv, apoi din 2 în 2 zile). Pe toată perioada de imunizare a iepurilor nu se produc modificări de comportament alimentar sau de sănătate. La 15, 27 și 48 de zile de la terminarea imunizării iepurilor se colectează serul în eprubete de sticlă. Exprimarea serului se produce în 1-2 ore, la temperatura camerei. Serul de iepure antiembrion de oaie și/sau capră se centrifughează la 3500 rot/min, timp de 10 minute pentru îndepărtarea eritrocitelor rămase, apoi se repartizează în fracții de câte 1 ml în tuburi Ependorf și se conservă la -18°C până la momentul utilizării la reacțiile de hemaglutinare. Serul obținut constituie serul antiembrion de oaie sau de capră (ser antiproteină asociată gestației).

Decongelare serurilor antiembrioni se face lent, la temperatura camerei. Înainte de utilizare în reacția de hemaglutinare, pentru a elimina anticorpii împotriva unor proteine comune care nu sunt specifice gestației, antiserurile se inactivează prin incubare la 56°C , în baie de apă, timp de o oră.

Etapă 3. Reacțiile de aglutinare folosind sânge integral heparinat de la oaie și/sau capră cu ser de iepure antiembrion de oaie și respectiv capră.

Se știe că reacția de hemaglutinare are la bază reacția antigen-anticorp, respectiv antigenii specifici gestației (Ag), fixați pe membranele celulare ale eritrocitelor de la femelele presupuse gestante și anticorpii antiembrioni din ser sanguin (Ac), obținut pe iepuri, consecutiv imunizării pasive cu omogent de embrioni preimplanționali în vârstă de 14 -15 zile.

Ca urmare a reacției imune, eritrocitele prezintă o aglutinare semnificativă, care poate se observa la un stereomicroscop sau chiar cu ochiul liber. Reacțiile de aglutinare sunt foarte sensibile: o cantitate mică de Ac poate aglutina o masă mare de eritrocite. De asemenea, hemaglutinarea este relativ rapidă, având loc în câteva minute la temperatura de $30-32^{\circ}\text{C}$ sau după 15-30 minute la temperatura camerei. Datorită sensibilității și rapidității reacției, aglutinarea directă/pasivă este utilizată pentru detecția de Ag specifici gestației cu anticorpi antiembrion de oaie sau capră.

Prezența reacției de aglutinare indică gestația (+), iar absența aglutinării indică negestația (-). Reacțiile dubioase s-au notat cu (+/-).

Concentrația Ac se determină prin titrare efectuând diluții seriate ale serului. La fiecare diluție succesivă concentrația Ac scade cu factorul 2. La o diluție prea mare nu va mai exista o cantitate suficientă de Ac care să reacționeze cu toți Ag specifici. Expresia precipitatului necesită formarea de agregate eritrocitare mari prin legarea de Ag specifici gestației de către Ac. Complexele mici rămân în suspensie. Formarea de complexe mari necesită ca atât Ag cât și Ac să fie multivalenți. Cantitatea de precipitat depinde atât de concentrația absolută de Ag și Ac, cât și de concentrația lor relativă. Dacă Ac sau Ag sunt în exces unul față de celălalt, se formează un număr mic de complexe solubile, precipitatul fiind redus cantitativ/absent și cu Ac, respectiv Ag liberi în soluție. Aceste situații dau naștere la reacțiile negative (-) sau dubioase (+/-). Pe măsură ce cantitățile de Ac și Ag se apropie una de cealaltă se formează precipitatul. Raportul de concentrație la care se formează cantitatea maximă de precipitat este în echilibru, în care nici Ac, nici Ag nu rămân liberi în soluție. Alte condiții, ca temperatura și pH-ul sunt importante în formarea precipitatului imun.

Reacțiile de hemaglutinare a eritrocitelor de la capre au folosit sânge integral colectat pe anticoagulant de la capre și oi gestante de 16-30 zile de la monta fecundă. Sângele heparinat colectat de la femele gestante se folosește imediat după colectare sau după o conservare scurtă la +4°C, de maxim 8 ore. Hemaglutinarea sângelui s-a realizat în plăci speciale de hemaglutinare. Serul antiembrion de oaie și capră, obținut în urma celor 3 colectări de sânge, se amestecă în volume pentru obținerea unei concentrații omogene de anticorpi, după care se efectuează o diluție (1/4) cu ser fiziologic. Pentru reacție se folosesc 20 μl de sânge și 20 μl de ser în plăci de hemaglutinare ce au fost acoperite cu parafilm, după care se incubează. Observarea reacției de hemaglutinare se verifică din 10 în 10 minute. Se notează absența aglutinării cu (-), prezența aglutinării cu (+) și rezultat dubios cu (-/+).

Omogenatul de ser antiembrion de capră a produs aglutinarea eritrocitelor în procent de 100% pe sângele caprelor gestante 16-21 zile și de 81% la caprele gestante de 40-50 zile. Lipsa aglutinării (-) a eritrocitelor provenite de la caprele în estru (sigur negestante) a fost de 93.75% iar reacțiile incerte sunt de 6.25%.

La oaie s-a stabilit un diagnostic pozitiv de 94,4% pe ser antiembrion, în diluție de 1/4, pentru sângele de la capre gestante în zilele 16-21 și de 91,11%

pentru sângele integral provenit de la oi gestante în zilele 40-50 de la montă. Reacțiile negative la oile în estru au fost de 77,7%, iar cele dubioase au reprezentat 22,32%.

Suplimentar, ca avantaj se poate menționa faptul că prin metodă, conform invenției, costul producerii antigenului embrionar este de aproximativ 10000-12000 lei, dar, care poate să producă importante cantități de ser antiembrion de oaie sau capră obținut după imunizarea iepurelui.

În urma procedurilor de diluții seriate, din 20 ml ser antiembrion brut se obțin 8000 doze la diluția 1/4 și 16000 doze la diluția 1/8. Costul unui test se reduce considerabil în raport cu diluția efectuată (astfel, costul serului antiembrion nediluat este de 27 lei, costul serului antiembrion diluat 1/4 este aproape un sfert din costul serului nediluat iar costul serului antiembrion diluat 1/8 este o optime din costul serului nediluat).

Procedeu de obținere a unui ser antiembrion de capră și de oaie

Revendicări

1. Procedeu de obținere a unui ser antiembrion de capră și de oaie utilizat în domeniul medicinei veterinare și în zootehnie pentru predicția precoce a gestației la rumegătoare **caracterizat prin aceea că** într-o primă fază embrioni preimplantaționali de ziua 14 și 15 de la monta fecundă sunt colectați în picături sterile de mediu PBS cu 4% BSA, și trecuți succesiv în 8-10 băi de mediu steril, apoi embrionii de oaie și de capră se omogenizează separat, prin agitare energetică în mediu PBS-BSA, din care rezultă un omogenat antigen embrionar care se amestecă în proporție de 1/1 cu adjuvant incomplet Freund, se repartizează separat pentru fiecare specie fiind într-o a doua fază pentru injectarea iepurilor pe o perioadă de imunizare de 15 zile după care se colectează serul de iepure antiembrion de oaie și/sau capră care se centrifughează la 3500 rot/min, timp de 10 minute, pentru îndepărtarea eritrocitelor rămase rezultând serul antiproteină asociată gestației care este supus unei reacții de hemaglutinare într-o a treia fază cu sânge integral heparinat de la oaie și/sau capră, aglutinarea realizându-se în intervalul de 15-30 minute la temperatura camerei, prezența reacției de aglutinare indicând gestația.